

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
ALINE DE LIZ RONSANI

**INOCULAÇÃO DA SOJA COM *Rhizophagus clarus* PRODUZIDO
EM SISTEMAS DE CULTIVO EM VASO E *IN VITRO*.**

Curitibanos
2016

ALINE DE LIZ RONSANI

**INOCULAÇÃO DA SOJA COM *Rhizophagus clarus* PRODUZIDO
EM SISTEMAS DE CULTIVO EM VASO E *IN VITRO*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Santa Catarina, campus de
Curitibanos, como pré-requisito para obtenção do Título
de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Sonia Purin da Cruz

Curitibanos
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ronsani, Aline de Liz
INOCULAÇÃO DA SOJA COM *Rhizophagus clarus* PRODUZIDO EM
SISTEMAS DE CULTIVO EM VASO E IN VITRO. / Aline de Liz
Ronsani ; orientador, Sonia Purin da Cruz - Curitiba, SC, 2016.
31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Fungos micorrízicos arbusculares. 3.
Soja. 4. Inóculo in vitro. I. Cruz, Sonia Purin da . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gabeardi km3
CP: 101 CEP: 89520-900 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ALINE DE LIZ RONSANI

Inoculação da soja com *Rhizophagus clarus* produzido em sistemas de cultivo em vaso e *in vitro*.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a): Sonia Purin da Cruz

Data da defesa: 05 de julho de 2016

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Sonia Purin da Cruz
Titulação: Ph.D.
Área de concentração em Microbiologia Ambiental
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Osmar Klauberg Filho
Titulação: Doutor
Área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo
Instituição: Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro Titular: Murilo Dalla Costa
Titulação: Doutor
Área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais
Instituição: EPAGRI - Lages, SC

Local: Universidade Federal de Santa Catarina
Campus de Curitibanos
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida.

A toda minha família, em especial meus pais Pedro Ronsani Neto e Eli de Liz Ronsani pelo imenso apoio, dedicação e conhecimento prático passado com muito carinho, fazendo-me cada vez mais ter certeza desta caminhada. Aos meus irmãos por todo incentivo e ajuda. A minha mãe Olinda, pelo carinho e atenção. E ao meu pai de coração Joel, que em suas conversas sempre me inspira e dá forças a ser melhor, além de me socorrer sempre nas horas de apuro.

A todos os mestres que tive a felicidade de conhecer pela competência, dedicação e conhecimento passado durante esses anos dentro e fora da sala de aula. Em especial a minha orientadora prof. Dra. Sonia Purin da Cruz pela oportunidade, dedicação, empenho e qualidade de seu trabalho, que acima de tudo mostrou a importância de ser uma profissional responsável e dedicada. Ela que sempre com seu jeito de mãe, orientou-nos a mostrar nosso maior potencial, dando puxões de orelha quando necessário e dando-nos chocolate de recompensa pelas horas a mais de trabalho no laboratório abaixo de frio e chuva. A ela devo muito que sei até agora, e agradeço pela confiança dada a mim.

A todos os servidores da UFSC Campus Curitibanos que direta ou indiretamente fizeram parte desta caminhada, sempre fazendo o possível para que tudo ocorresse da melhor forma.

Aos colegas pela amizade e por todos os momentos de agonia, tristeza e felicidade compartilhados, momentos esses que agora mais do que nunca temos certeza que valeram a pena. Em especial à Sabrina Carvalho Ronsani que me ajudou muito a estudar para Construções Rurais que foi meu mártir na faculdade, e pela amizade e companheirismo por esses 23 anos. A Marina Goetten, por hoje além de ser minha colega de trabalho, ser minha grande amiga.

Ao Grupo de Pesquisa em Microbiologia do solo por toda a ajuda nesses três anos de trabalho, em especial Gilmário Vilela Santos (Vulgo Mato Grosso) e Carla Candida que me acompanharam na maior parte.

Ao Murilo Dalla Costa pela oportunidade de estágio na EPAGRI sede Lages, que me possibilitou conhecer na prática as tantas teorias aprendidas.

“Desejo que você

Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.

Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.

Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.

Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.

Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.

Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,

Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.

Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama.”

Augusto Cury

Inoculação da soja com *Rhizophagus clarus* produzido em sistemas de cultivo em vaso e *in vitro*.

Aline de Liz Ronsani

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são simbioses obrigatórios e formam uma associação mutualística com a maioria das espécies vegetais estudadas. Por necessitarem de um hospedeiro vivo para completar seu ciclo, os FMAs não podem ser multiplicados em um meio de cultura definido. Com isso, não há uma metodologia adequada para a produção deste inoculante, limitando seu uso na agricultura. A partir do pressuposto, os objetivos deste estudo foram avaliar o potencial de inóculo da espécie *Rhizophagus clarus* no sistema de cultivo *in vitro* em relação ao sistema tradicional de cultura em vaso e testar o efeito do inoculante em sistema de cultivo em vaso e *in vitro* sobre o crescimento e a produtividade da soja. Foram realizados dois experimentos, ambos em condições de casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Catarina, no município de Curitibanos, SC (Latitude: 27° 16' 60" Sul, Longitude: 50° 35' 7" Oeste). A espécie utilizada foi *Rhizophagus clarus* (isolado RJN720A). No primeiro experimento, foram testados dois tratamentos: inóculo em vaso (T1), e inóculo *in vitro* (T2), com 4 repetições cada. A espécie vegetal hospedeira usada foi milho (*Zea mays*). O potencial de inóculo foi maior no tratamento 2, com 7,6% mais áreas colonizadas pelo fungo do que o tratamento 1. O tratamento com inóculo *in vitro* (T2) apresentou 7,6% mais hifas do que o tratamento com inóculo em vaso (T1). Para a variável vesícula, o aumento foi de 89% no tratamento 2. O segundo experimento consistiu em 3 tratamentos, sendo 1) testemunha, 2) inoculante em vaso, 3) inoculante *in vitro*. Foram avaliados o número de nódulos, nódulos viáveis, massa seca dos nódulos, massa seca da parte aérea, e massa de grãos por planta. Também foram avaliados a colonização micorrízica, e os percentuais de colonização por hifas, arbúsculos, esporos e vesículas. O tratamento com inoculante produzido *in vitro* (T3) promoveu um valor de número de nódulos 48% maior que o tratamento de inoculação em vaso (T2), e 53% superior que a testemunha (T1). A variável número de nódulos viáveis (NNV) apresentou o mesmo comportamento da variável avaliada anteriormente, com o tratamento 3 apresentando resultado superior (até 53%) que os demais tratamentos. As variáveis massa de nódulos (MSN), massa seca da parte aérea (MSPA) e produtividade não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Quanto à colonização micorrízica, corroborando com os demais dados, os valores registrados no T3 foram superiores ao T2 e T1, sendo 22% maior que o T2. A colonização por arbúsculos foi 38% superior no T3 em relação ao T2. Quanto à colonização por esporos, novamente os valores observados no tratamento T3 foram 50% maiores que no tratamento 2. Em relação à formação de hifas, o T3 foi 22% superior que o no T2. Para a variável colonização por vesículas o tratamento 3 também apresentou maior percentual, com 56% mais vesículas que o T2. De acordo com os dados gerados no presente estudo, pode-se afirmar que nas condições estudadas a melhor técnica de produção de inoculante de FMA para a soja foi o sistema *in vitro*.

Palavras-chave: Fungos micorrízicos arbusculares. Soja. Inóculo *in vitro*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares no milho após 4 semanas de crescimento.	21
Tabela 2 - Médias de número, massa seca de nódulos, massa secada parte aérea e produtividade no estágio R2.....	22
Tabela 3 - Taxa de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares na soja no estágio R2.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Adição do inoculante em vaso nos tubetes.	16
Figura 2 - Processo de inoculação das sementes com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .	18
Figura 3 - Inoculação do FMA, produzido no sistema em vaso.	18
Figura 4 - Inoculação do FMA, produzido no sistema <i>in vitro</i>	19
Figura 5 - Sinais de deficiência nutricional na soja.....	24

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 EXPERIMENTO 1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INÓCULO DA ESPÉCIE <i>Rhizophagus clarus</i> PRODUZIDOS NO SISTEMA EM VASO E <i>IN VITRO</i>	15
2.2 EXPERIMENTO 2. EFEITOS DA INOCULAÇÃO DA SOJA COM <i>Rhizophagus clarus</i> PRODUZIDO EM SISTEMAS DE CULTIVO EM VASO E <i>IN VITRO</i>	17
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 EXPERIMENTO 1	21
3.2 EXPERIMENTO 2	22
4 CONCLUSÕES	26
Abstract.....	27
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pertencem ao filo Glomeromycota, e neste filo existem cerca de 160 espécies identificadas (MORTON 1993). Estes fungos são simbiontes obrigatórios e formam uma associação mutualística com a maioria das espécies vegetais estudadas (WANG; LIU, 2004).

Por necessitarem de um hospedeiro vivo para completar seu ciclo, os FMAs não podem ser multiplicados em um meio de cultura definido, assim como é feito para produção de inoculante a base de rizóbios. Com isso, não há uma metodologia adequada para a produção deste inoculante, limitando seu uso na agricultura (SAGGIN JÚNIOR;LOVATO, 1999). Técnicas para elaboração do inoculante a base de FMA já existem, sendo que elas utilizam plantas hospedeiras ou cultura de raízes. Estas formulações são feitas *in vitro*, em hidroponia e em substrato, visando-se obter o meio mais puro e livre de contaminante possível (SOUZA *et al*, 2006).

Ao realizar a inoculação do FMA na planta ele irá beneficiar-se principalmente pela absorção de carbono que é fornecido pela planta hospedeira. Em contrapartida, o fungo transfere para as plantas nutrientes, principalmente fósforo, que melhoram as condições fisiológicas e aumentam o crescimento e a produção de biomassa (JAKOBSEN *et al*, 1992).

Miranda; Miranda (1997) observaram que quando plantas de soja são inoculadas com FMAs, mesmo em solos de alta fertilidade, a matéria seca é 20% superior em relação a plantas não inoculadas, assim como teores de fósforo que aumentaram 139% e nitrogênio 15%. Os dados corroboram com o que foi visto por Rein; Miranda, 1995, onde foi observado na dose de 27mg/dm³, um aumento de 296% de matéria seca da soja, em relação ao controle sem FMA. Resultados positivos são relatados também por Oliveira., (1998), onde o autor observou um aumento de 272% na nodulação quando as plantas foram inoculadas com FMA.

De acordo com estes e demais trabalhos realizados em nível nacional e mundial, inúmeros são os benefícios, tanto de crescimento como de nutrição, ao inocular FMAs em diversas culturas. Entretanto, a magnitude do benefício proporcionado pelos fungos às plantas pode variar em função de três principais fatores, que são: espécie vegetal hospedeira, isolado de FMA inoculado (sendo que

cada um possui características intrínsecas de sua origem/região onde é produzido) e meio em que o inoculante é produzido (que pode ser em vaso ou *in vitro*).

A natureza e a intensidade das interações entre isolado e planta dependem tanto das propriedades intrínsecas de cada fungo, bem como dos efeitos do solo e do hospedeiro. Contudo, a diferença na resposta da planta a diferentes isolados fúngicos já foi comprovada por autores tais como Haas; Krikun (1985). Eles avaliaram o efeito de 7 isolados diferentes de *G. macrocarpum* no pimentão, onde apenas 70% dos isolados afetaram significativamente no crescimento da planta. A diferença na capacidade de crescimento dos isolados foi evidente a partir de quatro semanas após a semeadura.

Na cultura da soja, Sala (2002) realizou um experimento, onde um de seus objetivos foi estudar a inoculação de FMA na soja, determinando os possíveis benefícios ao desenvolvimento da planta. A autora observou que quando as plantas foram inoculadas com a espécie *Rhizophagus clarus*, as mesmas apresentaram aumento em crescimento de 262% em relação a *Gigaspora margarita*. Contudo, observa-se uma compatibilidade na associação entre fungo e planta, resultado em benefícios na produção de matéria seca. A matéria seca produzida interfere significativamente na fotossíntese, pois com a maior disponibilidade de área fotossintética na planta, maior será a quantidade de fotoassimilados. Com isto, a planta terá mais nutrientes para disponibilizar na fase de preenchimento do grão, incrementando a produtividade da cultura.

Quanto à diferença de formulação do inoculante de FMA, há possibilidade de se obter diferentes respostas entre os sistemas em vaso e *in vitro*, visto que há diferenças entre o hospedeiro usado nos dois sistemas, o meio de cultura e a condição a qual o FMA está acondicionado nestes dois modos de cultivo.

O primeiro e mais tradicional método de cultivo de FMAs a ser desenvolvido foi o de cultura em vasos. Nesse sistema, um hospedeiro altamente dependente da associação micorrízica é inoculado com esporos de FMAs e transplantado para o vaso contendo uma mistura de solo, areia e argila. Após 3-4 meses de crescimento em casa de vegetação, o substrato pode ser coletado e utilizado como inoculante em experimentos de crescimento vegetal. Este sistema apresenta bons níveis de esporulação, e qualquer espécie fungica pode ser cultivada nele, pois problemas de compatibilidade entre fungo e hospedeiro ou substrato são raros (MORTON et al.,

1993). Por outro lado a garantia de pureza é problemática, visto que o substrato utilizado é geralmente de origem edáfica (WALKER; VESTBERG, 1994). Além deste entrave, a manutenção e estocagem são dificultadas, pois exige irrigação e requer espaço.

Outra alternativa de formulação do inoculante de FMAs foi desenvolvida em 1988 por Bécard; Fortin. Nesse sistema o fungo é cultivado em associação com raízes de cenoura ou chicória geneticamente transformadas em uma placa de Petri contendo meio de cultura com baixos níveis de nutrientes. Mediante esporulação, as placas são subcultivadas a cada 3-4 meses em ciclos sucessivos. Com o estabelecimento desta cultura os problemas de contaminação com outras espécies de FMAs e por outros fungos e bactérias são eliminados, o que garante a pureza do material. A manutenção é mínima e a estocagem é facilitada por necessitar de menos espaço. Em contrapartida, possui a limitação de que são poucas as espécies que podem ser cultivadas *in vitro* (CRANENBROUK *et al.*, 2005).

Contudo, as duas formulações do inoculante podem promover diferentes respostas de crescimento e/ou nutrição na planta hospedeira. Palowska *et al.*, (1999) realizou trabalho sobre a propagação *in vitro* e o ciclo de vida do *G. etunicatum*. Neste trabalho, além de avaliar o efeito da descontaminação na viabilidade dos esporos produzidos *in vitro*, a autora também fez a comparação entre as duas formulações do inoculante (à base de solo e *in vitro*). Observou-se que o desenvolvimento do esporo *in vitro* é semelhante ao produzido em ambiente natural do solo. Entretanto eles foram 60% menores e tinham paredes internas mais espessas do que esporos produzidos em sistema em vaso. Isso provavelmente se deve a abrasão do solo sobre o esporo que resulta em um aumento da parede exterior, deixando a mais espessa do que a produzida em sistema *in vitro*. Até o presente momento, o único trabalho reportado sobre esta problemática é o de Palowska *et al.*, (1999), em que houve uma comparação sobre as duas formulações de inoculante de FMAs. Pela grande escassez de conhecimento nessa área, este trabalho visa ir além do que já foi realizado em pesquisas atualmente nessa área.

Com isto, este trabalho irá preencher a lacuna de conhecimento sobre FMAs sobre as diferenças de resposta dos sistemas de cultivo *in vitro* e o sistema de cultivo em vaso, inoculados em uma espécie vegetal.

Os objetivos deste estudo foram: Avaliar o potencial de inóculo da espécie *Rhizophagus clarus* no sistema de cultivo *in vitro* em relação ao sistema tradicional de cultura em vaso; Testar o efeito do inoculante em sistema de cultivo em vaso e *in vitro* sobre o crescimento e a produtividade da soja. Com isto, poder-se-á saber de forma prática como os FMAs comportam-se na planta sendo oriundos de dois sistemas diferentes, visando viabilizar sua aplicação como novo produto no cenário de produção agrícola atual.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, ambos em condições de casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Catarina, no município de Curitibanos, SC (Latitude: 27° 16' 60" Sul, Longitude: 50° 35' 7" Oeste). O material biológico utilizado consistiu de inoculantes de FMAs de duas diferentes formulações: em vaso e *in vitro*.

A espécie utilizada foi *Rhizophagus clarus* (isolado RJN720A), mantida pela Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG), localizada na Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Todo o processo de produção de inóculo em vaso foi realizado pelo fornecedor do inóculo, prof. Dr. Sidney Luiz Sturmer. O solo e raízes foram coletados da área de interesse. As raízes foram então cortadas em pequenos pedaços (1-2 cm de comprimento) e homogeneizadas com o solo. O solo com raízes foram misturados com areia esterilizada na proporção de 1:1 (50% solo do campo + 50% areia estéril). Esta mistura foi acondicionada em potes plásticos de 1,5 Kg com aberturas na base. Após, 80 sementes de *Brachiaria brizantha* foram dispersas sobre a mistura e cobertas com uma mistura (1:1) de areia:argila expandida esterilizada. As culturas foram crescidas em casa-de-vegetação por 4 meses. Após este período, a rega foi suspensa e os potes foram deixados secar *in situ* em ambiente com baixa luminosidade natural. As culturas armadilhas foram estocadas em sacos plásticos tipo “zip-lock” 1 mês antes de recuperar os esporos de FMAs a serem utilizados para estabelecer culturas puras. Para a produção das culturas puras foi utilizada a mesma cultura armadilha da espécie *Rhizophagus clarus* (isolado RJN720A) citada acima.

A produção do inóculo *in vitro* foi conduzida no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Centro Curitibanos). O material utilizado foram os esporos produzidos no sistema de vaso, fornecidos pela CICG. Primeiramente, foi realizada a extração dos esporos através do protocolo de centrifugação por gradiente de sacarose de Gerdemann; Nicholson (1963). Em seguida foi realizada a desinfecção à base de cloramina T e antibióticos (sulfato de estreptomicina; 50mg/L e sulfato de gentamicina 25mg/L). O procedimento foi realizado dentro da câmara de fluxo laminar. Inicialmente, foram feitas lavagens dos

esporos com Tween 20 até a sua sedimentação. Após isto, retirou-se a solução detergente e foi adicionado cloramina permanecendo por 10 minutos. O mesmo foi feito com a solução de antibióticos, sendo este procedimento repetido duas vezes por 10 minutos. Foi realizada por duas vezes a lavagem com água destilada autoclavada. Depois de desinfetados, os esporos foram pipetados em placas de Petri contendo meio de cultura M, e acondicionados em câmara BOD na temperatura de 28° até a germinação. Raízes geneticamente transformadas de cenoura foram transferidas para essas placas com esporos germinados e livres de contaminação, e por fim levadas a câmara BOD na temperatura de 28°C por aproximadamente 90 dias.

2.1 EXPERIMENTO 1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INÓCULO DA ESPÉCIE RHIZOPHAGUS CLARUS PRODUZIDOS NO SISTEMA EM VASO E *IN VITRO*.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, com objetivo de avaliar o potencial do inóculo da espécie *Rhizophagus clarus* (isolado RJN 102A). Foram testados dois tratamentos: inóculo em vaso (tratamento 1), e inóculo *in vitro* (tratamento 2), com 4 repetições cada. A espécie vegetal hospedeira usada foi milho (*Zea mays*), pois apresenta alta compatibilidade com FMA. O substrato foi autoclavado pelo período de 50 minutos a 120°C. Como o cultivo durou menos de 4 semanas, não houve necessidade de as plantas receberem adubação.

As plantas foram cultivadas em tubetes plásticos de 300g, com substrato composto da proporção 1:1 de solo e areia previamente autoclavado.

No tratamento 1, a inoculação foi feita com material produzido em vaso. Para adquirir a quantidade de 50 esporos em cada tubete, calculou-se uma regra de três onde se levou em consideração a quantidade de esporos por grama de inoculante. Assim, obteve-se o valor de 0,8 g de inóculo a ser utilizado por tubete. Para a implantação do experimento, adicionou-se 150g da mistura de solo e areia na parte inferior do tubete. Logo após, colocou-se a mistura de inoculante (0,8g) com 150g do substrato (composto por solo e areia) em um béquer e fez-se homogeneização. Com este material, completou-se o volume total do tubete (Figura 1).



Figura 1. Adição do inoculante em vaso nos tubetes.

No tratamento 2, a inoculação foi feita com material produzido em condições *in vitro*. Com auxílio de uma lupa, marcou-se com um pincel marcador o local da placa onde havia 50 esporos e em contato com a raiz. Colocou-se 150g da mistura de solo e areia no tubete, logo após, cortou-se o fragmento de meio de cultura, raiz e esporos na marcação previamente realizada, e adicionou-se o fragmento ao tubete. Por fim, completou-se o volume total do tubete com a mistura de solo e areia (150g).

Em cada tubete, adicionou-se 3 sementes de milho a 3 cm de profundidade, e após a germinação fez-se o raleio. Por fim, regou-se os tubetes e também quando necessário até o fim do experimento, sendo que as plantas foram mantidas por 30 dias em casa-de-vegetação.

Ao final deste período, as plantas foram retiradas dos tubetes, batendo-se na lateral do mesmo para que as raízes se soltassem com facilidade. Separou-se a raiz da parte aérea através de um corte transversal na altura do coleóptilo. Após isto, as raízes foram lavadas para retirar excesso de solo, e foram acondicionadas em béquer de 100mL. A coloração foi realizada segundo metodologia de Koske; Gemma (1989). Para iniciar o procedimento, primeiramente aqueceu-se o banho-maria a uma temperatura de 80°C. Posteriormente, foi adicionada às raízes a solução de hidróxido de potássio (10%), e levadas ao banho-maria pelo período de 50 minutos. Após isto, lavou-se as raízes em água corrente e adicionou-se ácido clorídrico (2%). As raízes foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos. Ao retirar-se o excesso de ácido, adicionou-se a solução Azul de Tripán (5%). Em seguida, as raízes permaneceram no banho-maria por 50 minutos. Ao término do procedimento, elas foram lavadas e cortadas em 10 pequenos fragmentos de partes diferentes da raiz e colocadas em uma lâmina. Para visualização, cada um dos 10 fragmentos de

raiz foi dividido visualmente em 5 pontos. Usou-se microscópio óptico com aumento de 10 e 40x. A presença de estruturas observadas (hifas, arbúsculos, esporos e vesículas) foi registrada em cada ponto avaliado. O potencial de inóculo foi determinado pela estimativa de colonização radicular de fragmentos colonizados em relação aos não colonizados.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, e posteriormente foi realizada a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O software usado foi Assistat 2.0(SILVA; AZEVEDO, 2009).

2.2 EXPERIMENTO 2. EFEITOS DA INOCULAÇÃO DA SOJA COM RHIZOPHAGUS CLARUS PRODUZIDO EM SISTEMAS DE CULTIVO EM VASO E IN VITRO.

Este experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Foi utilizado solo peneirado e autoclavado a 120° pelo período de 50 minutos. Após esterilização, o solo foi acondicionado em vasos com capacidade para 11 litros, completando-se o volume de 9 litros de solo. A adubação de base utilizada foi superfosfato triplo (20g/vaso), cloreto de potássio (1,16g/vaso) e calcário (7,7g/vaso). Sendo que o calcário foi adicionado primeiramente no solo, deixando-o reagir pelo período de 2 dias.

Os tratamentos consistiram em 1) Testemunha 2) Inoculante de FMA produzido em vaso, 3) Inoculante de FMA produzido *in vitro*.

O isolado de FMA usado foi da espécie *Rhizophagus clarus* (RJN 102A). A variedade de soja utilizada foi BMX Ativa, previamente desinfetada com hipoclorito de sódio, e tratada com fungicida. A semeadura foi feita com 3 sementes por vaso e após emergência foi realizado o raleio, deixando apenas 1 planta por vaso. Após um mês do estabelecimento do experimento, aplicou-se a primeira dose inseticida e fungicida, para reduzir a incidência de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) e oídio da soja (*Erysiphe diffusa*). Os produtos usados foram Piori extra (2 ml/ calda) e Connect (2,5 ml/calda). Houve necessidade de reaplicação após 20 dias.

Todos os tratamentos receberam inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio da espécie *Bradyrhizobium japonicum* (estirpes SEMIA 5079 e SEMIA

5080). O inoculante comercial foi fornecido pela Empresa Total Biotecnologia, contendo a população bacteriana de 5×10^9 UFC/g, e foi aplicado na dose de 2g por Kg de semente previamente umedecidas com 6mL de calda açucarada 10%. A concentração final de bactérias foi de $1,2 \times 10^6$ UFC/g de sementes (Figura 2).



Figura 2. Processo de inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum*

No tratamento 1, as plantas foram inoculadas apenas com *Bradyrhizobium japonicum* e a adubação mineral recomendada para cultura.

No tratamento 2, as plantas receberam inoculação com FMAs produzido no sistema de cultivo em vaso. Foi utilizada a quantidade de 100 esporos em cada unidade experimental. Para tanto, foi aplicada a quantidade de valor de 80gem cada um dos vasos. A inoculação foi realizada adicionando-se ao redor das 3 sementes o inoculante a uma profundidade de 10 cm, após isto se cobriu a semente e o inoculante com solo, para não deixar exposto (Figura 3). Quando as sementes germinaram foi realizado o raleio, deixando somente 1 planta por vaso.

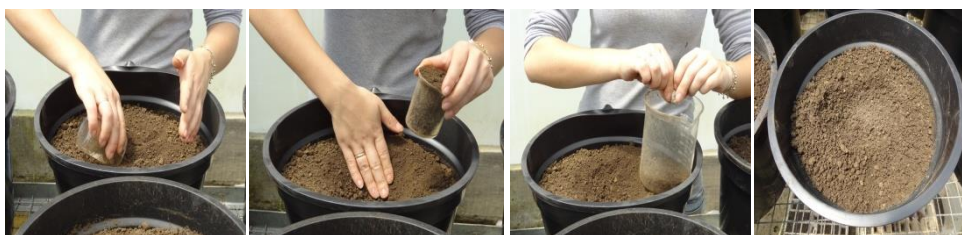


Figura 3. Inoculação do FMA, produzido no sistema em vaso.

No tratamento 3, foi utilizado inoculante produzido no sistema de cultivo *in vitro*. Com auxílio de uma lupa, marcaram-se com um pincel marcador partes da placa de Petri onde havia aproximadamente 100 esporos. Cortou-se um fragmento contendo meio de cultura, raízes e esporos. Em seguida, adicionou-se o fragmento

ao vaso, cobriu-se com solo e adicionando 3 sementes a 3 cm de profundidade (Figura 4).



Figura 4. Inoculação do FMA, produzido no sistema *in vitro*.

As plantas receberam irrigação todos os dias até o final do ciclo de crescimento. No estágio de florescimento pleno (R2) foi coletada 1 planta de cada tratamento. Os parâmetros avaliados foram: massa seca da parte aérea (g/planta; MSPA), número de nódulos por planta (NN), número de nódulos viáveis (NNV) e massa seca de nódulos (g/planta; MSN) e avaliação da colonização radicular por FMAs, dividida em percentual de colonização por hifas, vesículas, arbúsculos e esporos.

As plantas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da UFSC. Inicialmente, a parte aérea foi separada das raízes cortando-a no ponto de inserção dos cotilédones.

A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel pardo e levada à estufa de circulação forçada com temperatura média de 60°C por um período de cinco dias. Em seguida, a massa seca da parte aérea foi determinada em balança semi-analítica. As raízes foram lavadas e os nódulos foram separados e contados. Posteriormente, foram levados à estufa para secagem e determinação da massa seca de nódulos. Uma vez finalizado o processo da coleta de nódulos, as raízes foram descartadas. A avaliação de colonização micorrízica foi determinada no estágio R2, onde se aplicou o mesmo método usado para avaliação do potencial de inóculo. A única diferença adotada ao avaliarem-se as plantas de soja foi que o tempo de permanência nas soluções de hidróxido de potássio e Azul de Tripan foi de 60 minutos. A análise da produtividade foi realizada no estágio R2, as sementes foram coletadas e acondicionadas em sacos de papel e encaminhada a estufa a 60°C pelo período de 5 dias para secagem completa. A produtividade foi determinada pela produção em gramas de grão por planta.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente foi realizado análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O software usado foi Assistat 2.0(SILVA; AZEVEDO, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPERIMENTO 1

O potencial de inóculo dos isolados de FMAs testados no milho foi maior no tratamento 2, com 7,6% mais áreas colonizadas pelo fungo, do que o tratamento 1 (Tabela 1). O tratamento com inóculo *in vitro* (T1) apresentou 7,6% mais hifas do que o tratamento com inóculo em vaso (T2). Para variável vesícula, o aumento foi de 89% no tratamento 2.

Tabela 1. Taxa de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares no milho após 4 semanas de crescimento.

Tratamento	Colonização(%)	Hifas (%)	Vesículas(%)
T1	91b*	91 b	38 b
T2	98 a	98 a	72 a

* Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação ao potencial de inóculo de *R. clarus*, Silva-Junior; Siqueira (1997) realizaram um experimento, onde uma de suas comparações foi entre diferentes espécies de FMA na soja. Observou-se uma colonização de 45%, sendo superior com as espécies *S. heterogama* (22%) e *A. morrowiae* (30%). Quando comparado com o presente estudo a espécie *R. clarus*, apresentou um desempenho ainda maior chegando a 98% no tratamento com inóculo *in vitro*. Com isso, é importante mencionar que a dependência micorrízica de cada planta varia conforme a espécie de fungos a ser inoculada, podendo responder com altos níveis de colonização e até mesmo bem baixos (SIEVERDING, 1991).

Como este estudo é o primeiro relacionado à comparação da produção de inóculo em vaso e *in vitro*, não há bibliografia disponível para fazer maiores comparações. Contudo, a utilização do inóculo produzido *in vitro* pode aumentar ainda mais a colonização nessas plantas, quando comparado com inóculo em vaso. Possivelmente, isto proverá o aumento na massa e comprimento radicular, que irá aumentar a absorção dos nutrientes e principalmente o fósforo pela planta.

3.2 EXPERIMENTO 2

Na variável número de nódulos, o tratamento com inoculante produzido *in vitro* (T3) promoveu um valor 48% maior que o tratamento de inoculação em vaso (T2), e 53% superior que a testemunha, que sofreu apenas inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (T1). A variável número de nódulos viáveis (NNV) apresentou o mesmo comportamento da variável avaliada anteriormente, com o tratamento 3 apresentando resultado superior (até 53%) que os demais tratamentos. As variáveis massa de nódulos (MSN), massa seca da parte aérea (MSPA), produtividade não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de número, massa seca de nódulos, massa secada parte aérea e produtividade no estágio R2.

Tratamentos	Número de nódulos por planta no estágio R2	Número de nódulos viáveis no estágio R2	Massa seca de nódulos R2 (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa de grãos por planta (g).
T1	31 b*	31 b	0,09 b	18,64 ns	14,45ns
T2	28 b	28 b	0,16 ab	17,54	17,34
T3	58 a	58 a	0,31 a	20,47	14,54

* Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A associação micorrízica em leguminosas em conjunto com rizóbio aumenta a nodulação, pois a eficiência da fixação biológica do nitrogênio depende do balanço nutricional, principalmente do fósforo. A planta mal nutrida em fósforo e sem a colonização micorrízica irá comprometer a fixação do nitrogênio atmosférico e, consequentemente, a nodulação (OLIVEIRA, 1998). Em um trabalho realizado por Jesus *et al* (2005) com leguminosas arbóreas, os tratamentos sem inoculação de FMA's nas duas espécies avaliadas não apresentaram nodulação. O resultado inferior também foi visto na massa da parte aérea. Já Pereira *et al* (2013) observaram em um experimento sobre a interação dos FMAs na soja que quando a

espécie *R. clarus* foi inoculada, a nodulação teve um aumento de 248%. Isto evidencia a dependência micorrízica da espécie para realizar a fixação biológica de nitrogênio.

Quanto aos dados de massa seca registrados nesse estudo, Harris *et al* (1985) revelam que até 17% dos fotoassimilados produzidos até 42 dias da planta são consumidos pelos FMAs. Isso pode explicar a falta de resposta em relação a essa variável. Entretanto, os dados do trabalho de Nogueira; Cardoso (2000) divergem do que foi registrado no presente estudo e no citado anteriormente. Os autores observaram aos 90 dias que a massa seca da parte aérea aumentou em até 33% quando as plantas foram inoculadas com *G. intraradices*. Segundo Jakobsen, (1995) a resposta em crescimentos e deve a capacidade de transporte de P pelas plantas, e não na quantidade de carbono que o FMA consome.

Em relação ao número de grãos por planta, Fernández *et al.* (2006) realizaram um experimento testando a diferença entre a formulação do inoculante de FMA líquido e sólido. Foi observada diferença estatística, onde as plantas inoculadas com o líquido apresentaram um aumento de 28% em relação ao inoculante sólido. Estes dados não corroboram com o que foi visto por Planai *et al* (2008), sendo que o autor não encontrou diferença estatística para o rendimento, entre a formulação do inoculante sólido e líquido, assim como o que foi visto nesse estudo. Com isso, vemos que os benefícios causados pela inoculação de FMA nem sempre são expressados na produção final. Entretanto, as demais variáveis apresentaram resposta significativa entre os tratamentos.

Quanto à colonização micorrízica, de modo geral corroborando com os demais dados, os valores registrados no tratamento 3 foram superiores a tratamento 2 e tratamento 1, sendo 22% maior que o tratamento 2. Em relação a avaliação de colonização micorrízica, a variável de colonização por arbúsculos foi 38% superior no tratamento 3 em relação ao tratamento 2. Quanto à colonização por esporos, novamente os valores observados no tratamento 3 foram 50% maiores que no tratamento 2. Em relação à formação de hifas, o tratamento 3 foi 22% superior que o no tratamento 2. Para a variável colonização por vesículas o tratamento 3 também apresentou maior percentual, com 56% mais vesículas que o tratamento 2 (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares na soja no estágio R2.

Tratamento	Colonização total (%)	Colonização por arbusculos (%)	Colonização por esporos (%)	Colonização por hifas (%)	Colonização por vesícula (%)
T2	81 b	14 ab	14 b	81 b	41 b
T3	99 a	36 b	28 a	99 a	72 a

*Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A alta colonização e formação de estruturas nesse estudo podem estar relacionadas à condição nutricional. Durante o desenvolvimento, as plantas começaram a mostrar sinais de deficiência nutricional (Figura 5). Contudo, no estudo de Silva *et al* (2013); revela que a quantidade de P no solo influencia significativamente na colonização na planta e esporulação, sendo que quanto mais bem nutrida a planta menor o desenvolvimento ou atividade do FMA. Entretanto Bressan *et al* (2001), observaram que mesmo que a colonização tenha sido reduzida pelo teor nutricional da planta, a MSPA na soja foi superior em todos os tratamentos de inoculação de FMA. Isso mostra efeito à adição de P na planta, mesmo afetando a colonização.



Figura 5. Sinais de deficiência nutricional na soja

Sabe-se que a colonização dos FMA's é variável conforme a espécie de fungo a ser colonizado e a planta. O tomateiro, quando colonizado por *Glomus etunicatum*, apresentou uma taxa de colonização de 36,1% (ARAÚJO *et al.*, 1994). Já no café a colonização foi de 10,8% (SAGGIN JÚNIOR *et al.*, 1995). No sorgo, estes valores são de 80%, conforme registrado no trabalho de Silva *et al* (2013). Para a cultura da soja, os valores também variam conforme a espécie a ser inoculada. Quando a inoculação é realizada com *Gigaspora margarita*, a variação é de 62% a 87% (KALIL *et al.*, 1994). Já com o uso de *Rhizophagus clarus*, esses valores variaram de 3% a 59% (SIMPSON; DAFT, 1990), o que mostra maior micorrização da *Gigaspora margarita*, na soja, em relação a *Rhizophagus clarus*.

Em um estudo realizado por Bressan *et al* (2001) foi avaliado a colonização micorrízica na soja e sorgo, das espécies *G. etunicatum*, *G. margarita* e *R. clarus*. Este trabalho diverge com o que foi visto nesse estudo, observou-se até 65% a mais de colonização das espécies *G. etunicatum* (45%), *G. margarita* (35%) em relação a colonização da espécie *R. clarus* (15%). Entretanto no trabalho de José; Siqueira (1997), a colonização do *R. clarus* chegou a 50% na soja, sendo superior as espécies *A. morrowiae* (36%), *S. heterogama* (22%) e *G. margarita* (40%).

Nesse estudo a colonização chegou até 99%, ou seja, todos os fragmentos de raízes apresentaram algumas das estruturas avaliadas. Quando comparado aos trabalhos encontrados na bibliografia, este valor é bem elevado. Com isso, observa-se a alta qualidade do inóculo produzido, e a alta compatibilidade de *R. clarus* com a cultura da soja.

Como a bibliografia é reduzida em relação a inoculação de FMA's com diferentes formulações, faz-se necessária condução de estudos mais detalhados para que sua eficiência seja realmente comprovada.

4 CONCLUSÕES

Nas condições estudadas a melhor técnica de produção de inoculante de FMA para a soja foi o sistema *in vitro*.

Inoculation of soybean with *Rhizophagus clarus* produced in cultivation systems in the vessel and *in vitro* .

Aline de Liz Ronsani

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate symbionts that establish a mutualistic association with most studied plant species. Once completion of their life cycle requires a live host, they cannot be multiplied in a culture medium. Therefore, there is no adequate method to produce AMF inoculum, which limits its application in agriculture. Hence, the aims of this study were to evaluate the inoculum potential of *Rhizophagus clarus* in an *in vitro* versus pot culture system and to test the effects of *in-vitro* and pot culture inoculum on growth and yield of soybean. Two experiments were carried on, both in greenhouse conditions at the Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos – SC (Latitude: 27° 16' 60" South, Longitude: 50° 35' 7" West). The AMF species used was *Rhizophagus clarus* (isolate RJN720A). In the first experiment, two treatments were tested: pot culture (T1) and *in vitro* (T2) with four replicates. Host plant was maize (*Zea mays*). Inoculum potential was higher in treatment 2, with 7,6% more areas colonized by the fungus than treatment 1. *In vitro* inoculum had 7.6% more hyphae than pot culture inoculum. For vesicles, the percentage was 89% higher in treatment 2 than treatment 1. Experiment 2 consisted of three treatments: 1) control, 2) pot culture inoculum, 3) *in vitro* inoculum. Evaluations consisted of number of nodules, viable nodules, nodule dry weight, shoot dry weight and yield. Total mycorrhizal colonization and percentage of colonization by hyphae, arbuscules, spores and vesicles were also measured. Treatment 3 promoted increase in number of nodules by 48% compared to pot culture inoculum (T2) and 53% to the control (T1). The number of viable nodules was also higher in treatment 3. Nodule dry weight, shoot dry weight and yield were not different among treatments. Total mycorrhizal colonization was higher in T3 compared to T2 (22%). Colonization by arbuscules was 38% higher in T3 in relation to T2. Values of colonization by spores were again higher in T3 (50% more compared to T2). Root colonization by vesicles in T3 was 56% higher than in T2. Based on findings of the current experiment, it is possible to suggest that under the studied conditions the best technique for AMF inoculum production for soybean is the *in vitro* culture system.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi. Soybean. *In vitro* inoculum.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. P.; SILVA, E. M. R.; ALMEIDA, D. L. **Efetividade de fungos endomicorrízicos em tomateiro em diferentes níveis de fósforo no solo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v. 18, p. 193-199, 1994.
- BETHLENFALVAY, G.J.; FRANSON, R.L.; BROWN, M.S.; MIHARA, K.L. **The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*.** Physiol. Plant., 76:226-232, 1989.
- BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J. O.; VASCONCELLOS, C. A.; PURCINO, A. A. C. **Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados.** *Pesq. agropec. bras.* [online]. Vol.36, n.2, pp.315-323. ISSN, 2001.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; MOREIRA, F. M. S. **Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado.** *Pesq. agropec. bras.* [online], vol.34, n.9, p.1669-1677. ISSN 0100-204X, 1999.
- FERNÁNDEZ F.; DELL' AMICO J.M.; RODRÍGUEZ P. **Efectividad de algunos tipos de inoculantes micorrízicos a base de *Glomus* hoi "like" en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Va r. Amalia).** *Cultivos Tropicales* 27(3):25-30, 2006.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. **Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting.** *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46, 235-244, 1963.
- HAAS, J.H.; KRIKUN, J. **Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculum quantities required for growth response.** *New Phytol.*, 100:613-621, 1985.
- HARRIS, E.N.; GHARAVI, A.E.; TINCANI, A.; CHAN, J.K.H.; ENGLERT, H.; MANTELLI, P.; ALLEGRO, F.; BALESTRIERI, G.; HUGHES, G.R.V. **Affinity purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies** *J. clin. Lab. Immunol.* 17, 155, 1985.
- HODGE, A.; ROBINSON, D.; FITTER, A. H. **An arbuscular mycorrhizal inoculation enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrientrich patches in soil.** *New Phytologist*, Oxford, v. 154, n. 3, p. 575-584, 2000.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. **A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas.** Mycol. Res., 92:488-505, 1989.

JAKOBSEN, I. **Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas.** In: VARMA, A. & HOCK, B., eds. Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. Berlin, Springer-Verlag, p.297-324, 1995.

JAKOBSEN, I. **Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas.** In: VARMA, A. & HOCK, B., eds. Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. Berlin, Springer-Verlag, p.297-324, 1995.

JESUS, E. C.; SCHIAVO, J A.; FARIA, S.M. **Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais.** *Rev. Árvore* [online]. Vol.29, n.4, pp.545-552. ISSN 0100-6762, 2005.

KALIL, S.; LAYANACHAN, T. E.; TABATABAI, M. A. **Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars.** *Agronomy Journal*, Madison, v. 86, n. 6, p. 949-958, 1994.

KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; GEORGE, E. **Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize.** *New Phytologist*, Oxford, v. 116, p. 303-311, 1990.

LAMBAIS, M.R.; RIOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. **Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi.** *New Phytol.*, 160:421-428, 2003.

LAMBAIS, M.R. **Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae.** In: PODILA, G.K. & DOUDS Jr., D.D., eds. *Current advances in mycorrhizae research*. St. Paul, APS Press, p.45-59, 2000.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. **Spatial distribution of chitinases and beta-1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions.** *New Phytol.*, 140:33-42, 1998.

LI J.P.; ZHAO Z.W. **Mycorrhiza.** p 14:323–327, 2004.

LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. **Soil Science Society of American Journal**, v.45, p.852-855, 1981.

MIRANDA, J.C.; MIRANDA, L.N. **Micorriza arbuscular.** In VARGAS, M.A.; HUNGRIA, M. (ed). *Biologia dos solos dos cerrados*. Brasília: EMBRAPA-CPAC,. P. 69-123, 1997.

MORTON, J.B. 1993. **Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena.** *Mycorrhiza* 2: 97-109.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N.. **Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo.** *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. vol.24, n.2, pp.329-338. ISSN 0100-0683, 2000.

OLIVEIRA, R.S. **Alterações na dinâmica da competição entre estirpes de rizóbio pelos sítios de nodulação nas raízes de soja e suas conseqüências no crescimento da planta causadas por fungos micorrízicos arbuscular.** 1998. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

PAVINATO, P.S.; CERETTA, C.A. **Fósforo e potássio na sucessão trigo/milho: épocas e formas de aplicação.** *Ciência Rural*, v34, n.6, p.1779-1784, 2004.

PAWLOWSKA, T.E.; DOUDS, D.D.; CHARVAT, I. **In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*.** *Mycol. Res.*, 103, 1549-1556, 1999. ‘

PEREIRA, M. G.; SANTOS, C. E. R. S.; DE FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P.; DA ROCHA, G. S. D. C.; BARBOSA, A. T. **Interações entre fungos micorrízicos arbusculares, rizóbio e actinomicetos na rizosfera de soja.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina grande (PB). v.17, n.12, p.1249-1256, 2013.

REIN, T. A.; MIRANDA, J. C. C. **Variação na resposta a micorriza arbuscular em função da granulometria do fertilizante fosfatado.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 25., 1995, Viçosa. Resumos expandidos: volume 1. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, p. 415-417, 1995.

ROJAS, P.E.; SIQUEIRA, J.O.; SANTOS, J. G. D. **Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais.** *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. vol.30, n.3, pp. 413-424. ISSN 1806-9657, 2006

SALA, V. M. R. **Atividade Microbiana do Solo e a Interação de Diazotróficos Endofíticos e Fungos Micorrízicos Arbusculares na Cultura do Trigo Piracicaba.** Dissertação (Mestrado) –Universidade de São Paulo. p 123, 2002.

SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. **Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.19, p.221-228, 1995.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; LOVATO, P. E. **Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas**. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. L.; FAQUIM, V. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas, Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Ufla, p. 725-773, 1999.

SILVA JUNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O. **Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja**. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Campinas, v. 1, n. 9, p. 35-41, 1997.

SIMPSON, D.; DAFT, M. J. **Spore production mycorrhizal development in various tropical crop hosts infected with *Glomus clarum***. Plant and Soil, Dordrecht, v. 121, n. 2, p. 171-178, 1990.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn, Germany. 1991.

SIEVERDING E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany Eschborn. ISBN 3-88085-462. 1991

SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; LOVATO, P. E. **Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas**. In: Siqueira, J. O. (Org.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818p.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components. Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In: WORLD. CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software**. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p.393-396, 2006.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1,p71-78, 2002.

SILVA, F. A. S. **The ASSISTAT Software: statistical assistance**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

SMITH S.E.; READ D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 3^a ed. Academic, London. 815 p, 2008.

STAHL, P.D.; SMITH, W.K. **Effects of different geographic isolates of *Glomus* on the water relations of *Agropyronsmithii***. Mycologia, 76:261-267, 1984.

SOUZA, V. C. de; SILVA, R. A. ; CARDOSO, Gleibson D. and BARRETO, Artur F. **Estudos sobre fungos micorrízicos**. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* [online]. Vol.10, n.3, pp.612-618. ISSN 1415-4366. 2006

TEDESCO, M.J.; GIABNELLO, C.; BISSANI, C.A. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2^a ed, Porto Alegre, Departamento de solos, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 1995, 174 p. (Boletim técnico 5)

WANG, F.; LIU R. J.; LIN X.G.; ZHOU J.M. **Mycorrhiza**. 14:133–137, 2004.

WALKER, C; VESTBERG, M. **A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi**. *Agric. Sci. Finland* 3:233-240, 1994.